



Методы диагностики вирусных инфекций





Диагностика инфекционных болезней базируется на всестороннем и систематическом изучении больного животного, которое включает сбор анамнеза (в том числе эпидемиологического), объективное динамическое обследование органов и систем, анализ результатов лабораторного и инструментального обследования.





I. Анамнез

Анамнез (anamnesis; греч. anamnēsis воспоминание) — совокупность сведений о больном и его заболевании, полученных путем опроса





Основные разделы анамнеза

Анамнез болезни и анамнез жизни.
Каждый из них собирается по
определенному плану





***Анамнез жизни* (anamnesis vitae)**

Включает в себя информацию о происхождении животного, условиях его содержания, кормления, водопоя, назначении животного, перенесенных заболеваниях, а также о ветеринарных обработках и исследованиях





Анамнез болезни (anamnesis morbi)

- это совокупность сведений о том, когда заболело животное;
- каковы признаки заболевания;
- была ли оказана животному терапевтическая помощь, и если да, то кто, как и сколько времени лечил;
- есть ли еще животные с аналогичными признаками болезни и сколько таких животных.





II. Клинические методы диагностики инфекционных болезней



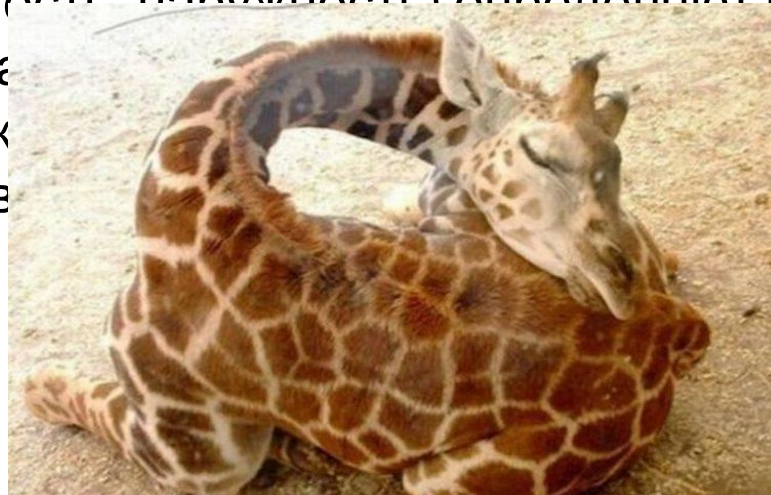


Оценка общего состояния

СОСТОЯНИЯ

Определение габитуса.

Габитус (лат. habitus — внешность, шаржированность) определяется по совокупности внешних признаков (позу), упитанность, телосложение животного в момент исследования.





При осмотре кожных покровов учитывают окраску кожи – бледность (анемию), гиперемия, желтушность (иктеричность), отсутствие сыпи (экзантемы). Если обнаружена сыпь, нужно выяснить сроки ее появления, обратить внимание на локализацию, распространение, характер высыпных элементов (розеолы, петехии, папулы, везикулы, пустулы), скопление их на определенных участках тела (насколько это возможно у данного животного).

Уши с НСП, также, относятся к коже.





Осмотр конъюнктивы и слизистой оболочки рта

Также, учитывается цвет слизистых (анемия, гиперемия, иктеричность), их увлажнение, наличие повреждений, экссудация



ASM MicrobeLibrary.org © Walton and Suchman



Пальпация лимфатических узлов, брюшной, тазовой полостей





III. Лабораторно-инструментальны е методы инфекции





Инструментальные методы

- УЗИ
- Рентген
- МРТ
- Аускультация фонендоскопом
- Термометрия
- И т.д. и т.п. в зависимости от выявленного при осмотре



Лабораторные методы

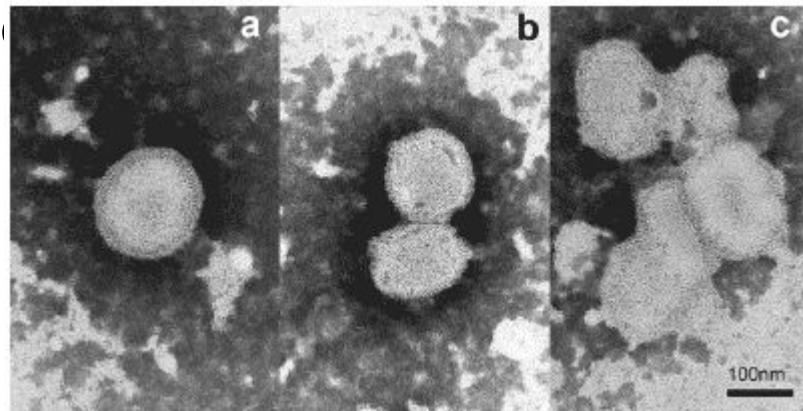
- 1) общеклинические исследования (мочи, кала, желудочного и дуоденального содержимого, ликвора, экссудатов, трансудатов и других биологических жидкостей);
- 2) гематологические исследования (крови, костного мозга и др.);
- 3) цитологические исследования;
- 4) биохимические исследования (во всех биологических жидкостях),
- 5) микробиологические исследования, включающие вирусологические методы исследования;
- 6) иммунологические методы (в том числе и серологическая диагностика);
- 7) молекулярно-генетические методы (ДНК-зондирование, полимеразно-цепная реакция — ПЦР)





Вирусологическое исследование (световая микроскопия)

Позволяет обнаружить характерные вирусные включения, а электронная микроскопия — сами вирионы и по особенностям их строения диагностировать инфекцию





Вирусологическое исследование направлено на выделение вируса и его идентификацию.

Для выделения вирусов используют заражение лабораторных животных, куриных эмбрионов или культуры тканей.

Первичную идентификацию выделенного вируса до уровня семейства можно провести с помощью:

- *определения типа нуклеиновой кислоты (проба с бромдезоксиуридоном);*
- *особенностей ее строения (электронная микроскопия);*
- *размера вириона (фильтрование через мембранные фильтры с порами диаметром 50 и 100 нм);*
- *наличия суперкапсидной оболочки (проба с эфиром);*
- *гемагглютининов (реакция гемагглютинации);*
- *типа симметрии нуклеокапсида (электронная микроскопия).*



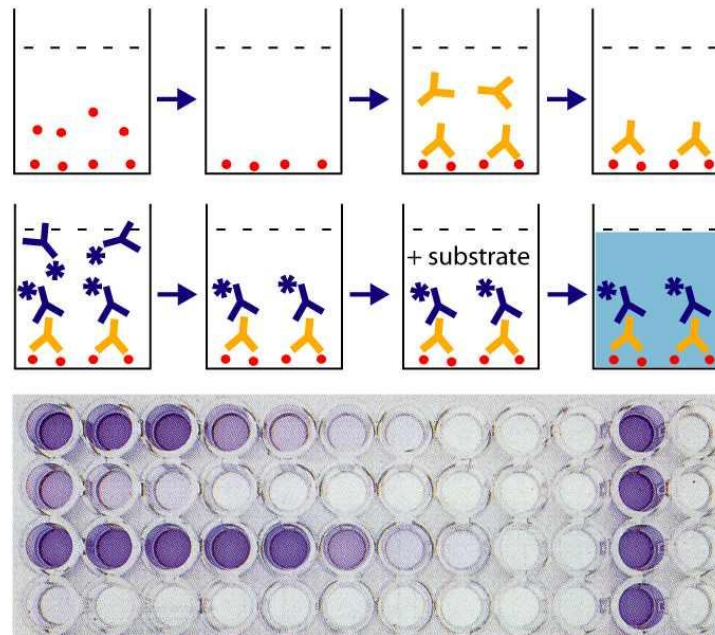
Методы иммунодиагностики (серодиагностики и иммуноиндикации)

- радиоизотопный иммунный анализ (РИА);
- иммуноферментный анализ (ИФА);
- реакция иммунофлюоресценции (РИФ);
- реакция связывания комплемента (РСК);
- реакция пассивной гемагглютинации (РПГА);
- реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и др.





Иммуноферментный анализ (ИФА)





Иммуноферментным анализом (ИФА) называют лабораторные исследования, базирующиеся на специфичности и высокой степени избирательности иммунологической реакции "антиген-антитело".

Принято различать несколько десятков вариаций ИФА (прямой, непрямой, метод блокирования, конкурентный). Наибольшей популярностью пользуется гетерогенный твердофазный иммунный анализ или ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).





Преимущества ИФА

- ❖ Высокая специфичность и чувствительность метода ИФА (более 90%).
- ❖ Возможность определения заболевания и отслеживания динамики процесса, то есть сравнение количества антител в разных временных промежутках.
- ❖ Доступность ИФА-диагностики в любом медицинском учреждении





Относительный недостаток

Выявление и
самого возбу





Вспомним

Антитела (или иммуноглобулины - Ig) – специфические белки, вырабатываемые В -лимфоцитами в ответ на попадание в организм инфекционного агента

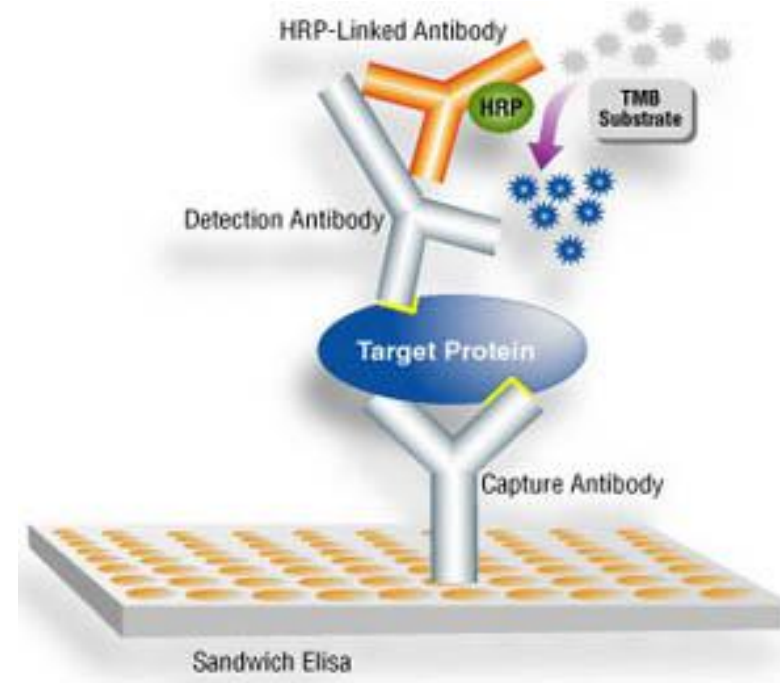
Антигены – высокомолекулярные вещества органического происхождения, в частности возбудителей инфекционных и других заболеваний, а также вещества различных измененных клеток, образующихся при той или иной болезни (аутоиммунные заболевания, онкология).

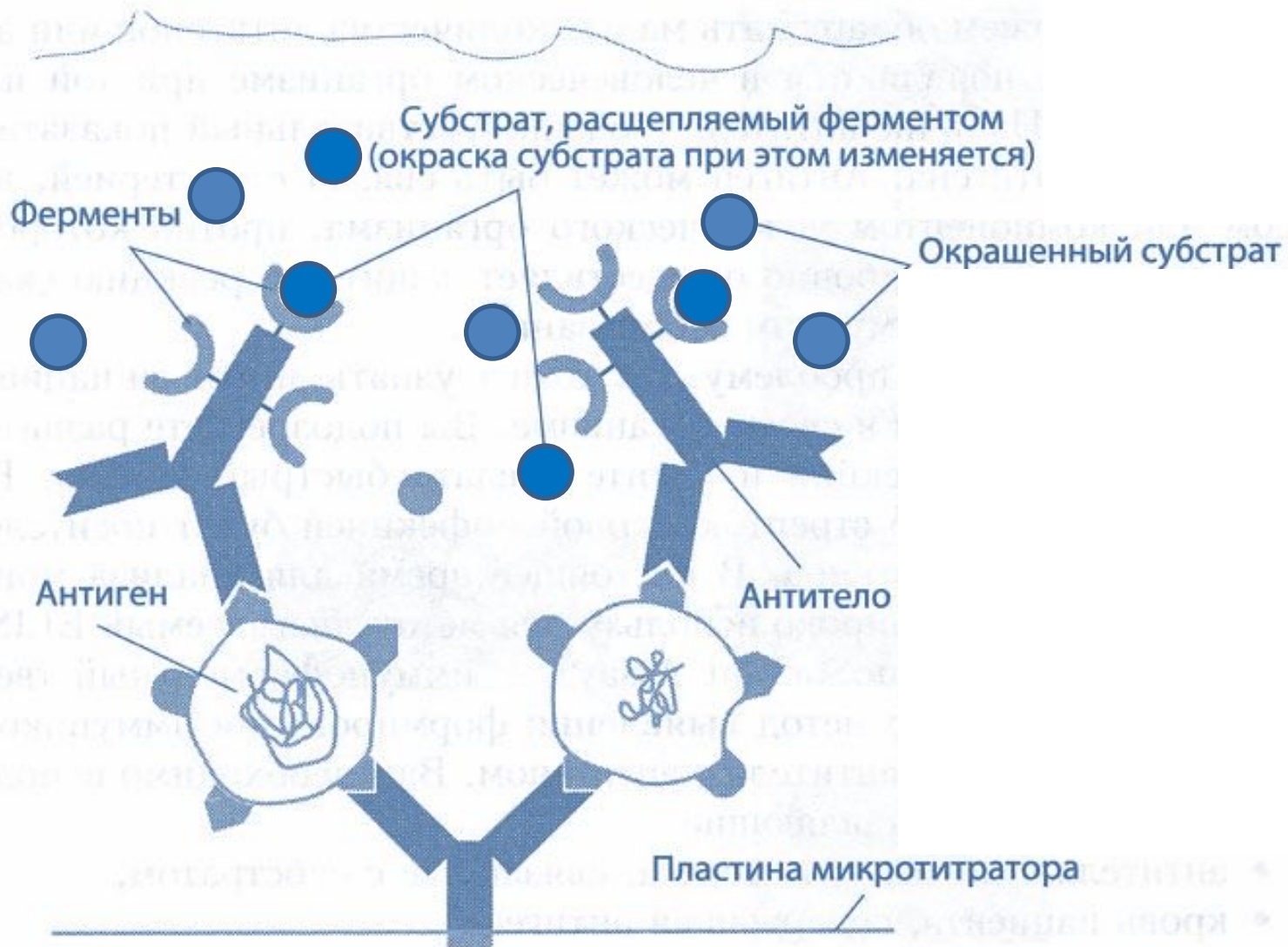
Иммунный комплекс – комплекс антиген-антитело, участвующий в иммунном процессе.





Суть иммуноферментного анализа составляет иммунная реакция антигена и антитела с образованием иммунного комплекса антиген-антитело, в результате которого происходит изменение ферментативной активности специфических меток на поверхности антител







Этапы ИФА

1) На поверхности лунок планшета находится очищенный антиген определенного возбудителя. При добавлении биологического материала (сыворотки крови) пациента происходит реакция между этим антигеном и искомым антителом (иммуноглобулином). Это соединение будет выступать «особым антигеном» в следующем этапе.

2) На данном этапе идет образование ИК (иммунных комплексов) - реакция между «особым антигеном» и конъюгатом (иммуноглобулин, меченый ферментом пероксидазой). Добавляется особый хромоген. Результатом такой ферментативной реакции является образование окрашенного вещества в лунке планшета, интенсивность окраски которого зависит от количества содержащихся в материале пациента иммуноглобулинов (антител).

3) Далее происходит оценка результата: фотометрирование с помощью многоканального спектрофотометра, сравнение оптической плотности исследуемого материала с оптической плотностью контрольных проб, математическая обработка результатов.



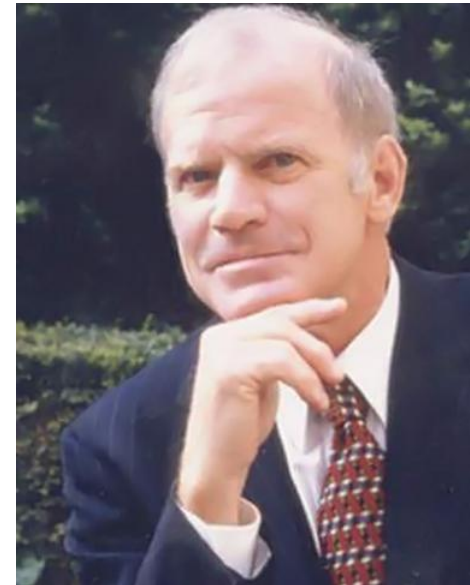


Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В начале 1970-х годов норвежский учёный Хьелль Клеппе предложил способ амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочных молекул ДНК, но идея осталась не реализованной

Изобретена в 1983 году

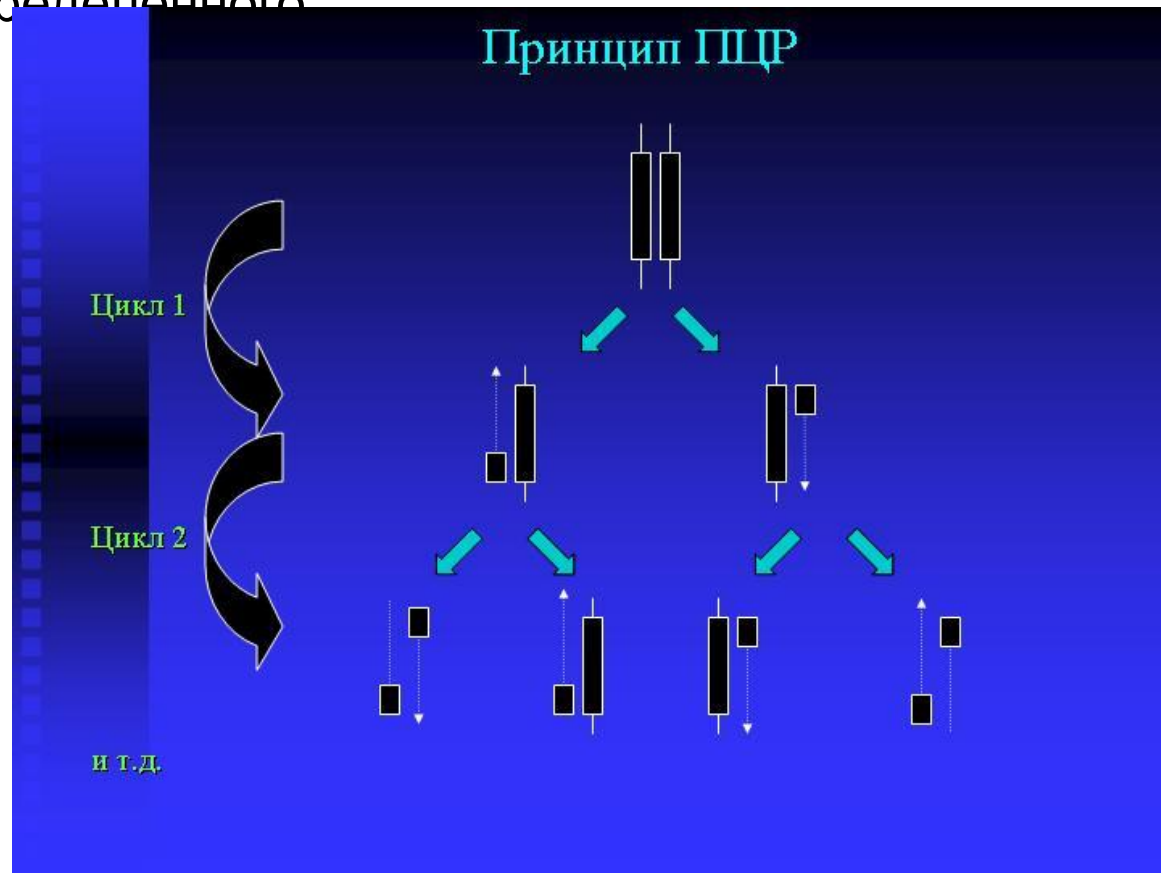
Кэри Мюллисом (Kary Mullis)





Метод ПЦР основан на амплификации ДНК *in vitro* (с помощью ДНК-полимеразы), осуществляющей синтез взаимно комплементарных цепей ДНК. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого

участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.





✓ Денатурация

Расплетание двойной спирали ДНК

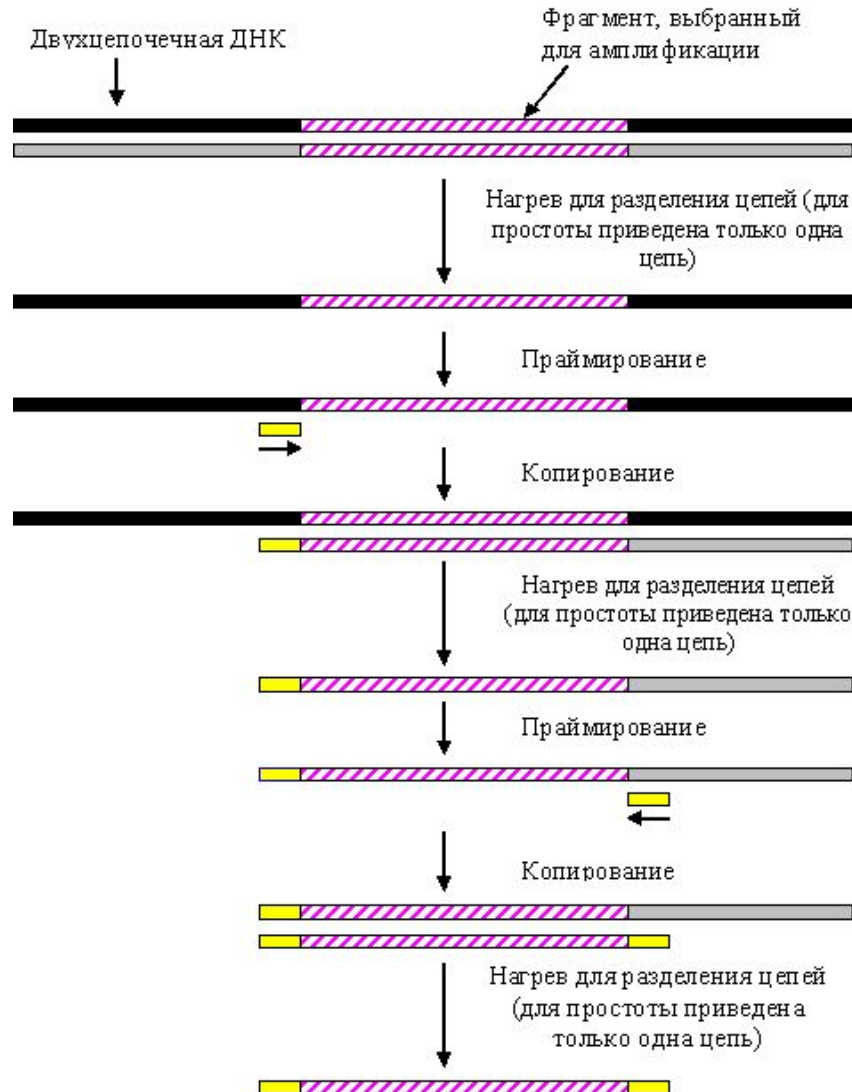
✓ Отжиг

Расхождение нитей ДНК и последующая комплементарная достройка обеих с помощью специального фермента Taq-полимеразы на олигонуклеотидную затравку (праймер)

✓ Элонгация (синтез).

Синтез комплементарной цепи ДНК







Правила хранения и транспортировки образцов

Смывы со слизистых и выделения берут с помощью ватных палочек (лучше-стерильных), помещают в пробирки Эппендорфа, с 0,5 мл физраствора (обрезая пластиковую палочку или обламывая деревянную).

Кровь :

ИФА – сыворотка крови (биохимическая пробирка)

ПЦР – цельная кровь с ЭДТА

Материал для анализов доставляется в лабораторию в день взятия или на следующий день. Допускается хранение в холодильнике (4°C) в течение 1-2 дней.

Нельзя сдавать кровь с гепарином на ПЦР!





Спасибо за внимание!

